

複合組織移植における血行障害に対する 持続動脈内注入法に関する実験的研究

奈良県立医科大学整形外科科学教室

前 田 昌 己

EXPERIMENTAL STUDY OF CONTINUOUS INTRA-ARTERIAL INFUSION FOR CIRCULATORY DISTURBANCE IN TISSUE TRANSPLANTATION

MASAMI MAEDA

Department of Orthopaedic Surgery, Nara Medical University

Received September 2, 1990

Summary : Causes of unsuccessful replantation after major or minor amputation and tissue transplantation include postoperative thrombosis of the anastomotic site, which is caused by narrowing of the recipient vessels secondary to intimal injury due to trauma and radiation therapy, and no-reflow phenomenon as a result of prolonged interval between completion of vascular anastomosis and reperfusion of the vessels in addition to unskillful vascular anastomosis.

Systemic administration of anticoagulants and fibrinolytic agents has the primary measure for the prevention of postoperative thrombosis of the anastomotic site, but the success rate of these operations has not reached 100%. So, it was considered that direct infusion of these drugs into the regional artery may be more effective for improving the results of replanted or transplanted tissue.

After determining the minimum necessary rates of local intra-arterial infusion of heparin and urokinase by preliminary experiments, we compared the take of a free flap thrombosis model by administering these agents intra-arterially or systemically from the middle of the operation to examine the effectiveness of local intra-arterial administration.

Next, since fibrinolytic agents such as streptokinase and urokinase are reported to be effective for the prevention of no reflow phenomenon, the effectiveness of continuous local intra-arterial administration of anticoagulants and fibrinolytic agents for the prevention of reperfusion injury was examined in an ischemic flap model. Comparative evaluation using radical scavengers indicated that their concomitant use beneficial if ischemia is prolonged.

Index Terms

continuous intra-arterial infusion, reperfusion injury, anticoagulant, fibrinolytic agent, radical scavenger

I 緒 言

微小血管吻合による組織移植失敗の原因として血管吻合技術の未熟さもさることながら、外傷や放射線治療に

よる移植床血管の中・内膜損傷による管腔の狭小化が存在するために術後吻合部血栓を生じる場合がある。さらに血管吻合を終了して血流を再開するまでに長時間を要した際、あるいは術後血流傷害に気づかず長時間経過

した後、再手術を行った場合に発生する no-reflow phenomenon も注目されている。

術後吻合部血栓を防止するためには、抗凝固剤や線溶剤の全身投与（持続静脈内注入）が行われてきたが、それでもなお 100 % の成功には程遠いものがあった。そこで、生着率をさらに向上させる方法として、局所の動脈内にこれらの薬剤を直接注入するのが有効ではないかと考えた。

そこで、実験的に遊離皮弁血栓形成モデルを作製して術中より抗凝固剤と線溶剤を持続的に局所動脈内に注入した場合と全身投与した場合の生着率を比較した。

次に、streptokinase や urokinase などの線溶剤が no reflow phenomenon に対して有効であったとする報告^{1),2)}から、再灌流傷害に対しても抗凝固剤と線溶剤の局所持続動脈内注入法が効果を示すのではないかと考え、実験的に阻血皮弁モデルを用いて検討した。

II ウサギ下腹壁皮弁を用いた血栓形成モデルへの応用

①抗凝固剤と線溶剤の投与量決定

局所持続動脈内投与を行う利点としては、全身投与に比較して血液中の阻害物質に拮抗されたり臓器で代謝されることなく目的とする部位に有効に作用する点があげられる。さらに、投与量を調節することにより、出血傾向という全身的な副作用を起こさず局所でのみ有効な効果を発揮するのではないかと考えられた。

そこで、動脈内注入により必要とする部位でのみ有意に血中濃度を上昇させえるような抗凝固剤と線溶剤の投与速度を決定するために以下の二つの実験を行った。

実験 1 では、抗凝固剤として heparin を、線溶剤として urokinase を選んで数種類の投与速度で注入した。そして、凝固・線溶系検査を行ってその作用を検討した。

実験 2 では、実験 1 で得た血液学的データより heparin と urokinase の投与速度を定め、動脈内注入した場合と静脈内注入した場合を比較検討した。

〈実験 1 : heparin と urokinase の動脈内注入〉

1. 実験材料

体重 2.0 kg の雄ウサギ（日本白色種）を 30 羽使用した。

2. 実験方法

a) 麻酔

pentobarbital sodium (25mg/kg) の静脈内注入を用いた。

b) 注入ならびに採血方法 (Fig. 1)

一侧の大腿動脈より 24 ゲージのカテーテルを逆行性

に腹部大動脈まで挿入して固定した。このカテーテルから、各 5 羽のウサギにつき heparin を 200, 20, 2 U/kg/h の速度で注入した。さらに、各 5 羽のウサギにつき urokinase を 2000, 200, 20 IU/kgKh の投与速度で注入した。そして、目的とする反対側の伏在動脈と、離れた部位である耳中心動脈から注入前ならびに、4 時間後に 4 ml ずつ採血した。

3. 検索方法

各薬剤のモニターとして heparin は、活性化部分トロンボプラスチン時間（以下 APTT）とヘパリン濃度を urokinase は、アンチプラスミンを測定した。

a) APTT

アクチン（国際試薬）を用い、測定機 Coagstat（国際試薬）で測定した。

b) ヘパリン濃度

テストチームヘパリン（第 1 化学）を用い、測定機 Cobasfara（Roche 社）を使用して合成気質法で測定した。

c) アンチプラスミン

テストチーム 2 キット（第 1 化学）を用い、測定機

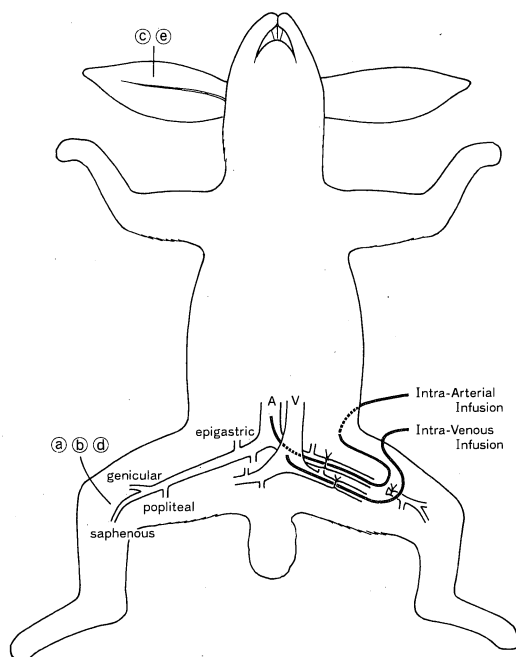


Fig. 1. Experimental phase 1.

a : Before infusion

b : 5 min. after infusion, saphenous artery

c : 5 min. after infusion, central artery

d : 4 hrs. after infusion, saphenous artery

e : 4 hrs. after infusion, central artery

Cobasfara (Roche 社) を使用して合成気質法で測定した。

なお、検査結果は対応のある場合の Wilcoxon test を用い、統計学的解析を行った ($p < 0.05$)。

4. 結果

a) APTT (Table 1)

200U/kg/h で heparin を動脈内注入した場合、4 時間後には目的とする伏在動脈だけでなく耳中心動脈においても、APTT は 300 以上まで上昇した。また、20 U/kg/h の動脈内注入でも、程度の差はあるが、伏在動脈と中心動脈で同様の上昇を示した。そして、2U/kg/h の動脈内注入では注入前と比較して両部位ともほとんど変化を示さなかった。

b) ヘパリン濃度定量 (Table 2)

200U/kg/h ならびに 20U/kg/h で heparin を動脈内

注入することにより、4 時間後には程度の差はあるものの伏在動脈ならびに中心動脈で増加を示した。しかし、2U/kg/h の動脈内注入では両部位とも変動はなかった。

c) アンチプラスミン (Table 3)

2000IU/kg/h ならびに 200IU/kg/h で urokinase を動脈内注入することにより、4 時間後には伏在動脈ならびに耳中心動脈で同様の減少を示した。しかし、20IU/kg/h を動脈内注入した時は、両部位とも注入前に比較してさほどの変化はなかった。

5. 小括

heparin を 200 ならびに 20U/kg/h で動脈内注入することにより、目的とする局所ばかりでなく全身での代謝を受けたと考えられる部位でさへ薬剤の効果が認められた。しかし、2U/kg/h の注入速度では、両部位とも検査値に変化が見られず、注入された局所で血中の阻害物質

Table 1. APTT (sec.)

※ $p < 0.05$

a : Before infusion

b : 5 min. after infusion, saphenous artery

c : 5 min. after infusion, central artery

d : 4 hrs. after infusion, saphenous artery

e : 4 hrs. after infusion, central artery

Heparin (U/kg/h)	Ⓐ	Ⓑ	Ⓒ	Ⓓ	Ⓔ
200 (I. A)	29.5±2.9	—	—	300<	300<
20 (I. A)	30.3±4.7	—	—	59.3±8.9	58.9±10.1
2 (I. A)	27.6±4.2	—	—	27.0±3.9	26.8±6.1
10 (I. A)	29.6±6.2	49.9±14.4*	31.2±6.5	52.3±10.8*	34.6±8.1
10 (I. V)	29.2±4.9	33.9±4.0	35.5±3.9	35.0±3.7	36.6±3.2

Table 2. Heparin concentration (mg/dl)

※ $p < 0.05$

a : Before infusion

b : 5 min. after infusion, saphenous artery

c : 5 min. after infusion, central artery

d : 4 hrs. after infusion, saphenous artery

e : 4 hrs. after infusion, central artery

Heparin (U/kg/h)	Ⓐ	Ⓑ	Ⓒ	Ⓓ	Ⓔ
200 (I. A)	0.09±0.02	—	—	4.66±0.75	4.62±0.58
20 (I. A)	0.09±0.02	—	—	0.73±0.06	0.74±0.05
2 (I. A)	0.08±0.02	—	—	0.08±0.04	0.08±0.04
10 (I. A)	0.10±0.01	0.50±0.19*	0.11±0.01	0.59±0.13*	0.10±0.01
10 (I. V)	0.09±0.01	0.10±0.13	0.10±0.03	0.10±0.02	0.10±0.13

Table 3. Antiplasmin (%)

※ $p < 0.05$

a : Before infusion

b : 5 min. after infusion, saphenous artery

c : 5 min. after infusion, central artery

d : 4 hrs. after infusion, saphenous artery

e : 4 hrs. after infusion, central artery

Heparin (U/kg/h)	(a)	(b)	(c)	(d)	(e)
2000 (I. A)	112.0±8.0	—	—	84.0±7.9	82.3±7.5
200 (I. A)	118.3±4.2	—	—	94.3±5.0	96.0±4.0
20 (I. A)	106.3±8.1	—	—	99.0±6.0	100.3±4.6
100 (I. A)	117.6±9.0	102.6±11.0*	115.8±11.5	96.6±9.1*	111±8.9
100 (I. V)	117.4±15.9	116.6±16.1	115.4±18.0	107.4±11.9	108.4±13.0

によりすでに拮抗されているものと判断された。

urokinase に関しては、2000 ならびに 200IU/kg/h で動脈内注入することにより、両部位で薬剤の効果が認められたが、20IU/kg/h の注入速度では効果は現れなかった。

〈実験 2 : 動脈内注入と静脈内注入との比較〉

1. 実験材料

体重 2.0 kg の雄ウサギ (日本白色種) を 10 羽使用した。

2. 実験方法

a) 麻酔

pentobarbital sodium (25 mg/kg) の静脈内注入を用いた。

b) 注入ならびに採血方法 (Fig. 1)

動脈内投与の場合には、〈実験 1〉と同様に大腿動脈内に挿入したカテーテルより薬剤を注入した。静脈内投与の場合は、一侧の大腿静脈から逆行性に腹部大静脈まで挿入したカテーテルより薬剤を注入した。実験 1 の結果から投与速度を heparin は 10U/kg/h, urokinase は 100IU/kg/h とし、5 羽ずつ大腿動脈内ならびに大腿静脈内に注入した。そして、反対側の伏在動脈ならびに耳中心動脈から注入前、開始 5 分後ならびに 4 時間後にそれぞれ 4 ml ずつ採血した。

3. 検索方法

heparin のモニターとして APTT, ヘパリン濃度を urokinase のモニターとしてアンチプラスミンを測定した。

なお、検査結果は対応のある場合の Wilcoxon test を用い、統計学的解析を行った ($P < 0.05$)。

4. 結果

a) APTT (Table 1)

動脈内注入：注入開始後 5 分ではもちろん 4 時間後でも伏在動脈からの血液では注入前に比して有意に上昇したが、耳中心動脈ではさほどの変動を示さなかった。

静脈内注入：両部位とも有意の変化はなかった。

b) ヘパリン濃度 (Table 2)

動脈内注入：注入開始後 5 分だけでなく 4 時間後でも伏在動脈から採血した血液でのみ注入前に比較して有意に増加した。

静脈内注入：両部位とも有意の変化を示さなかった。

c) アンチプラスミン (Table 3)

動脈内注入：開始後 5 分後だけでなく 4 時間後でも伏在動脈からの血液でのみ注入前に比較して有意に減少した。

静脈内注入：両部位とも有意の変化を示さなかった。

5. 小括

動脈内注入法を選択することにより、局所での薬剤の濃度を必要最少量で有意に高めることができた。一方、同投与速度で静脈内投与しても全身での代謝を受けるためか、まったく効果を示さなかった。

②ウサギ下腹壁皮弁移植を用いた血栓形成モデルへの効果

外傷例に施行する遊離組織移植の場合には、受傷時に移植床動・静脈は挫滅されて血管内膜の肥厚、管腔の狭小化をきたしていることが多く、これが成功率を低下させる要因のひとつであると考えられている。

実験的に福居・玉井³⁾は、ウサギを使用して予め行った結紮操作により内膜肥厚をきたした移植床動脈に反対側の下腹壁皮弁移植を行った場合、成功率は 40 % であったと報告している。このモデルを利用して皮弁の移植前より第 II 章で決定した投与速度で heparin と urokinase

の局所持続動脈内注入法を併用し、持続静脈内注入の場合と比較した。

1. 実験材料

体重 2.0 kg の雄ウサギ（日本白色種）を 42 羽使用した。そのうち、動脈内注入群には 22 羽、静脈内注入群には 20 羽を使用した。

2. 実験方法

a) 麻酔

pentobarbital sodium (25 mg/kg) の静脈内注入を施した。

b) 遊離皮弁血栓モデルの作製

一側の伏在動脈を剥離して上膝動脈分岐部から 3 cm 末梢部を結紮した。そして、9 週間飼育を続けることで剥離した伏在動脈の内膜は肥厚し、管腔は狭小化した。この伏在動脈を移植床動脈とすることにより吻合部に血栓を形成しやすい遊離皮弁血栓モデルを作成することができた。

c) 下腹壁皮弁の移植 (Fig. 2)

上記の操作により 9 週間飼育したウサギを使用した。結紮操作を行った伏在動脈とは反対側の鼠径部に下腹壁動・静脈を含めるように 5×3 cm 大の紡錘形皮弁を作図した。まず、周辺の皮膚切開を加えて皮下組織を bipolar coagulator で焼き切りながら panniculus carnosus を含めて皮弁を挙上した。下腹壁動脈を大腿動脈分岐部から末梢へ約 1 cm ほど剥離し、下腹壁静脈から分離した。さらに大腿静脈は、下腹壁静脈分岐部の中枢ならびに末梢側に約 1 cm ずつ剥離を加えた。そして、下腹壁動脈は分岐部直下で、下腹壁静脈は大腿静脈の一部をつけて切離することで皮弁を完全に遊離した。

遊離した下腹壁皮弁を反対側に移動し、結紮操作により内膜肥厚を起こして管腔の狭小化した伏在動脈と皮弁

の下腹壁動脈とを端々吻合した。そして、皮弁の大腿静脈と移植床の大腿静脈とを端々吻合して血流を再開した。その後、感染予防のために術後 tobramycin 20mg を 7 日間毎日筋肉内注射した。

d) 持続注入法 (Fig. 3)

実験に必要な器具は、① swivel, ② 金属管, ③ カテーテル, ④ 持続注入機, ⑤ スタンドならびに⑥ クランプである。各器具を Fig. 3 のごとく組み立てるわけであるが、接続部 1 は、24 G 注射針をカテーテル内に挿入して延長チューブと接続した。接続部 2 は、金属板先端のステンレス板を皮下に埋め込み、縫合することで脱出を防ぐことができた。また、固定部位を両腸骨稜の中央とすることで四肢によって引抜かれる危険も解消された。

以上の方法にて必要な薬剤を持続的に無麻酔、無拘束で 7 日間にわたり注入し続けることができた。

3. 検索方法

a) 皮弁生着率

遊離皮弁血栓形成モデルにおいて第 II 章で決定した投与量の heparin と urokinase を血管吻合前より、7 日間持続的に動脈内注入を行った場合と、静脈内注入を行った場合の皮弁生着率を未治療のコントロール群と比較した。皮弁生着の判定は術後 14 日目に行い、その結果は、 χ^2 test を用いて統計学的に比較した ($P < 0.05$)。

b) 組織学的所見

また、伏在動脈吻合部の内膜が注入前後で変化する可否かを調べるため、吻合部近くの動脈を採取して HE 標本を作成し、内膜の厚さを比較した。注入前の標本としては動脈吻合直前に末梢の一部を、注入後としては 2 週後に屠殺した際、動脈吻合部中枢側より採取した。

4. 結果

a) 皮弁生着率 (Table 4)

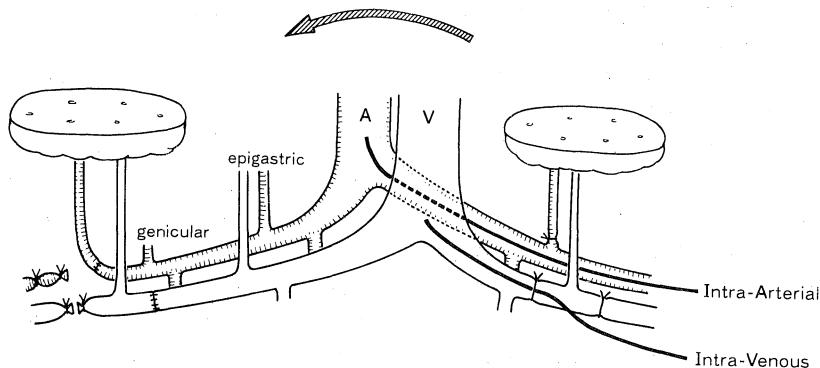


Fig. 2. Experimental phase 2.
Free flap transfer (right side to left side)

皮膚、皮下組織ともに生着したものを成功例とした。動脈内注入群のうち、2羽は術後2日目に死亡したため各群とも20羽ずつで皮弁の生着率を評価した。

コントロール群：20皮弁のうち、8皮弁が生着した(40%)。

動脈内注入群：20皮弁のうち、16皮弁が生着した(80%)。

静脈内注入群：20皮弁のうち、7皮弁が生着した(35%)。

動脈内注入群はコントロール群だけでなく、同量を静脈内注入した場合と較べても有意に皮弁生着率が向上した。一方、静脈内注入群ではまったく効果が得られなかった。また、動脈内注入群の失敗例4例のうち、2例は術直後よりわずかではあるが創縁からの出血が止らず、翌日には皮弁の色調は赤黒くなり、剖検時には壊死になった組織の下に多量の血腫が形成されており、動・静脈ともに血栓で閉塞していた。他の2例では、皮下脂肪は残っていたが、大部分の皮膚は壊死におちいていた。

b) 組織学的所見 (Plate 1)

動脈の同一部位を観察したわけではなく、ホルマリン固定による収縮の程度も異なるため統計学的な評価を行うことはできなかったが、動脈内膜の厚さは動脈内注入を行うことにより、減少傾向を示すことがわかった。

5. 小括

ウサギを使用して内膜肥厚のある移植床動脈への下腹壁皮弁移植術に際し、heparin 10U/kg/h, urokinase 100IU/kg/hの投与速度で7日間、局所持続動脈内注入することにより、コントロールならびに静脈内注入群に比して有意に生着率を向上させることができた。

また、薬剤の直接作用とは断定できないが動脈内注入を続けることにより肥厚した動脈内膜径が減少することがわかった。

III ウサギ下腹壁皮弁を用いた再灌流傷害モデルへの応用

各種臓器における虚血後再灌流時に生じる組織障害は、虚血そのものよりもむしろ活性酸素が主な原因であると言われてきた。

一方、1981年 Jacobs ら¹⁾は rat 下腹壁皮弁阻血モデルにおいて、streptokinase を動脈内注入することにより皮弁生存率を向上させたと述べている。また、1987年、Zdeblick ら²⁾は rat 切断肢阻血モデルにおいて、urokinase を動脈内注入することにより生着率を高めるこ

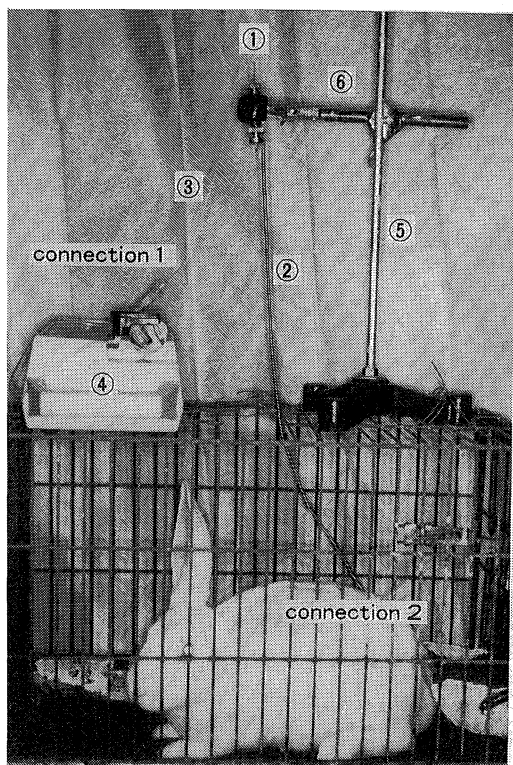


Fig. 3. Method of continuous infusion.

- ① : swivel
- ② : metallic spiral tube
- ③ : catheter
- ④ : infusion pump
- ⑤ : stand
- ⑥ : clamp

Table 4. Survival rate of flaps (mean %)

	CASE	SUCCESS	FAILURE	SURVIVAL RATE
Control	20	8	12	40 %
Intra-Arterial Infusion	20	16	4	80 %
Intra-Venous Infusion	20	7	13	35 %

とができたと報告しており、線溶剤でも再灌流障害に対し効果があることが証明されている。

そこで著者は、再灌流障害に対して抗血栓剤と抗酸化剤を併用するのが理想的ではないかと考え、ウサギ下腹壁皮弁阻血モデルを使用してその有用性を検討した。さらに、阻血時間ならびに注入薬剤の種類を変えることにより、灌流再開後の皮弁内にどのような傷害が起こっているかを検討した。

1. 実験材料

体重2.0~2.5 kgの雄ウサギ(日本白色種)を計116羽を使用した。そのうち、皮弁生着率を評価するために82羽、組織学的変化を観察するために29羽を使用した。残りの5羽は、手術中に死亡した。

2. 実験方法

a) 麻酔

阻血皮弁作成時には pentobarbital sodium: 30 mg/kg を静脈内に投与し、一旦覚醒させて一定時間皮弁を阻血状態にした後、再灌流時には halothan-air によるマスク麻酔を用いた。感染予防のために術直後、3日目ならびに7日目に cefamandole: 250 mg/kg を静脈内投与した。

b) 阻血皮弁の作製 (Fig. 4)

まず、一側の下腹壁動・静脈を栄養血管とする8×4 cm大の下腹壁皮弁を挙上し、分岐部より末梢の大腿動・静脈を結紮して切離した。さらに、中枢側も結紮して皮弁を完全な阻血状態とし、元の位置にもどして縫合した。その後、ウサギを室温約20度に調節された動物室に移動し、一定時間後に再度麻酔して結紮部を切除後、再吻合を行い血流を再開した。

c) 実験群 (Table 5)

実験は阻血時間と注入方法により、以下の9群に分けた。

I群は10時間阻血、II群は12時間阻血を行った。sub-groupとしてそれぞれに、aはコントロール、bは抗血栓剤の持続動脈内注入、cはlactated Ringer液5 mlのみ

の動脈内注入、そしてdとして抗酸化剤の動脈内注入を行った。さらにII群には、eとして抗血栓剤の持続動脈内注入と、抗酸化剤の動脈内注入の併用群を追加した (Table 5)。

そのうち、抗血栓剤の持続動脈内注入群には、抗凝固

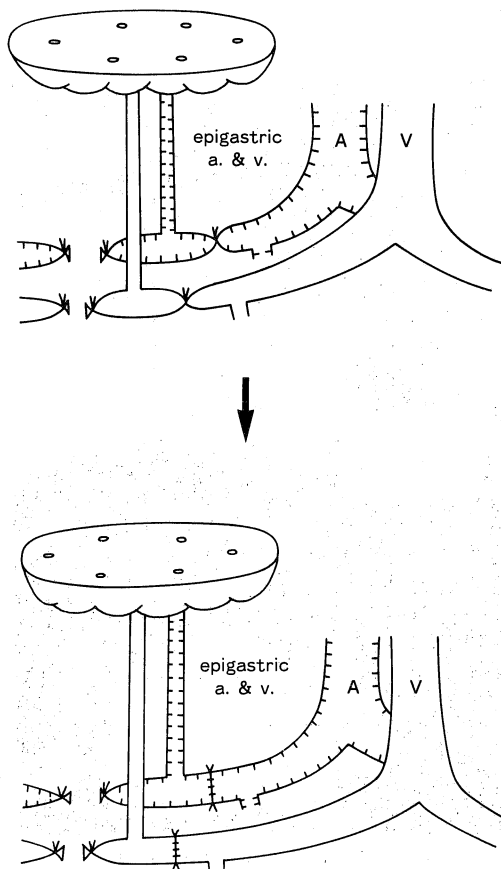


Fig. 4. Experimental method of ischemic flaps. Vascular anastomosis was performed at the site of ligation.

Table 5. Experimental groups of ischemic flaps

Group	I a	I b	I c	I d	II a	II b	II c	II d	II e
Ischemic Time (hours)	10	10	10	10	12	12	12	12	12
Heparin & Urokinase	—	○	—	—	—	○	—	—	○
SOD & Catalase	—	—	—	○	—	—	—	○	○
Lactated Ringer	—	—	○	○	—	—	○	○	○

剤として heparin 20U/kg/h を、線溶剤として urokinase 200IU/kg/h の投与速度で、反対側の大腿動脈より腹部大動脈まで逆行性に挿入したカテーテルから、再灌流直前より7日間持続的に注入した (Fig. 5).

また、抗酸化剤の動脈内注入群は superoxide dismutase (以下 SOD) : 30000U/kg と catalase : 30000U/kg を lactated Ringer 液 5ml に溶解し、同側の大腿動脈末梢より逆行性に挿入したカテーテルより、再灌流直前より約 30 分で注入した (Fig. 6).

I-a 群, II-a 群のみ両側に、その他は一側に皮弁を作成した。I-a 群は 7 羽, II-a 群は 5 羽そのほかは 10 羽に以上の実験を行った。

3. 検索方法

a) 皮弁色調の肉眼的所見

各群につき再灌流前, 30 分後, 3 日目ならびに 14 日目の皮弁の色調を肉眼的に観察した。

b) 下腹壁動・静脈の顕微鏡的所見

下腹壁動・動脈本幹ならびに皮弁下部の血管を手術用顕微鏡下に観察し、特に再灌流開始 30 分後ならびに 3 日目の下腹壁静脈中極部と末梢部の還流の有無を比較した。

c) 皮弁生着率

14 日後に Jacobs ら¹⁾の方法で判定した。その結果は、t-検定にて統計学的に比較した。

d) 組織学的所見

I-a 群ならびに II-a 群は、各 4 皮弁ずつ作成し、それぞれ再灌流前, 30 分後, 3 日目ならびに 7 日目に皮弁

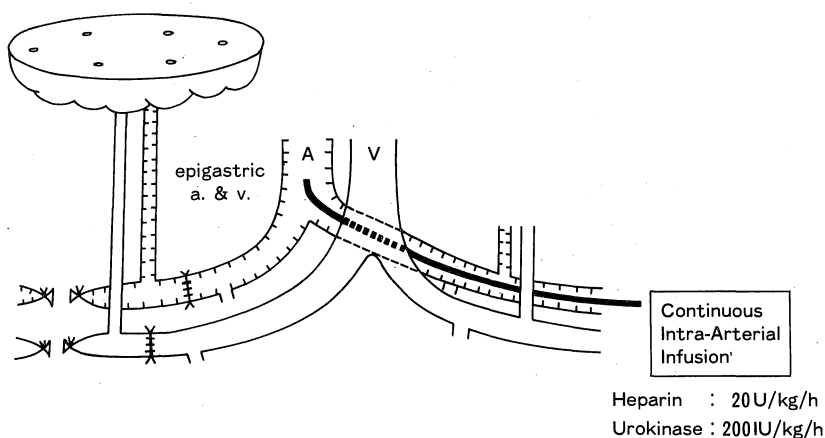


Fig. 5. Continuous intraarterial infusion of antithrombotic agents.

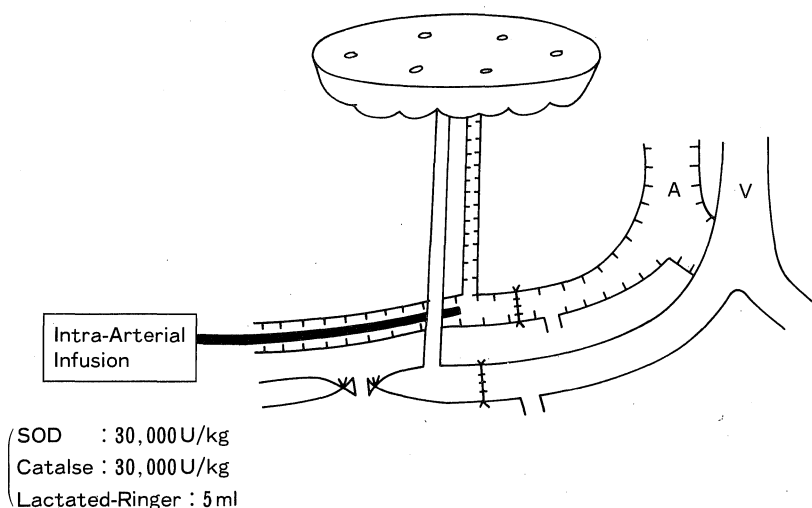


Fig. 6. Intraarterial infusion of radical scavengers.

を採取した。その他の群では、3皮弁ずつ作成し、それぞれ30分後、3日目ならびに7日目に皮弁を採取後、H-E標本を作製した。

4. 結果

a) 皮弁色調の肉眼的所見

再灌流直前：阻血時間にかかわらず阻血直後は蒼白であったが、再灌流直前には皮膚直下の血管茎は黒く透けて見えた。

30分後：再灌流直後には、皮弁の色調は直前とさほどの変化はないが、30分経過すると全体的に赤紫がかって見えた。この変化は、阻血時間が長いほど強い傾向があった。

3日後：各群の違いが明瞭となった。I-b群ならびにII-e群は、鮮紅色を呈した。その他の群では、ほとんどの皮弁において部位は一定しないが部分的に赤黒くなっていた。

14日後：I-b群ならびにII-e群は大部分が生着した。その他の群では、3日目に赤黒くなっていた部位が壊死に陥っていることが多かった。

b) 下腹壁動・静脈の顕微鏡的所見 (Table 6)

再灌流直前：阻血時間にかかわらず、下腹壁静脈内には明らかな血栓はみとめられないが、全長にわたって黒くなり血液が停滞していた。下腹壁動脈は内腔をみたと血液が存在しないため収縮したままであった。

再灌流直後：阻血時間にかかわらず動脈拍動はすぐに出現した。

30分後：II-a, b, c群では、下腹壁静脈の還流は観察されなかったが、I群の全てならびにII-d, e群では、下腹壁静脈中枢部での還流が観察された。しかし、皮弁下部の末梢部では停滞したままであった。

3日後：II-a, b, c群は、下腹壁静脈中枢ならびに末梢部とも血栓が形成されていた。I-a, c, d群ならびにII-d群では、中枢部での還流は認められたが末梢部は停滞したままであった。

一方、I-b, II-e群は中枢ならびに末梢とも静脈還流を確認した。

c) 皮弁生着率 (Table 7)

10時間阻血群のI-a群7羽のうち、1羽は死亡した。残った12皮弁は、大部分が部分的壊死を起こしその生着率は54%だった。その他の実験群には術後死亡例はなく、それぞれ10皮弁から生着率を判定した。I-c, d群も同様に、ほとんどが部分的な壊死を示した。その生着率は、それぞれ68%と53%であった。一方、I-b群は10皮弁全てが完全生着し、I-a, c, d群に比し有意に生着率が向上した ($p < 0.05$)。

12時間阻血群のII-a群10皮弁は、ほとんどが壊死に陥り、わずかな部分が生存しているだけで、その生着率は13%だった。II-b, c, d群もほぼ同様の変化を示した。それぞれの生着率は27, 16, 36%で、II-b, d群はコントロールに比較してやや広い範囲が生存していたが、有意差はなかった。II-e群の10皮弁のうち、一羽のみが50%の生着であったほかは完全に生着し、II-a, b, c, d群に比して有意に生着率が高かった ($p < 0.01$)。

d) 組織学的所見

I-a群 (Plate 2)：再灌流直前、正常 (Plate 3) に比較すると、赤血球は血管内に充満しているが漏出した部位はなかった (Plate 2a)。再灌流開始後30分では、赤

Table 7. Survival rate of flaps
(mean \pm sem %)

* : $p < 0.55$

** : $p < 0.01$

Group	Number	Survival Rate (%)
I a	12	54 \pm 45
I b	10	100 \pm 0*
I c	10	68 \pm 19
I d	10	53 \pm 44
II a	10	13 \pm 22
II b	10	27 \pm 37
II c	10	16 \pm 22
II d	10	36 \pm 33
II e	10	95 \pm 16**

Table 6. Return of epigastric vein

Venous Return (epigastric vein)		I-a	I-b	I-c	I-d	I-d	II-a	II-b	II-c	II-d
30 min.	proximal	+	+	+	+	-	-	-	+	+
	distal	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3 days	proximal	+	+	+	+	-	-	-	+	+
	distal	-	+	-	-	-	-	-	-	+

血球の漏出を一部に認めた (Plate 2b). 3 日目には、この変化は一層著明となり、赤血球だけでなく炎症細胞も皮弁全層に浸潤していた (Plate 2c). 7 日目には大部分が壊死に陥っていた。

I-b 群 (Plate 4, 5): 3 日目でも I-a 群で認められた炎症細胞の浸潤は存在したが、赤血球の血管外への漏出部位は少なかった (Plate 4b). しかし、汗腺や毛根などの付属器は温存されているが、正常例と比較すると皮膚は薄くなり内部を走行する血管も減少していた (Plate 4a). 7 日目でもこれらの所見は同様で、残存する血管の壁は肥厚し (Plate 5a)、筋肉には空胞変性像がみられ、すでに大部分が炎症細胞で置換されていた (Plate 5b).

II-a 群 (Plate 6): 再灌流直前すでに赤血球の漏出部位を一部認めた (Plate 6a). 再灌流開始後 30 分には、この変化はさらに著明となった (Plate 6b). 3 日目には、皮弁全体に赤血球が充満し、筋肉だけでなく膠原線維も変性像が明瞭となった (Plate 6c). 7 日目には、完全壊死像を示した。

II-d 群 (Plate 7): 再灌流開始後 30 分では、II-a 群 (Plate 6b) に比し、赤血球の漏出は明らかに抑制されていた。

II-e 群 (Plate 8): I-b 群と同様の変化を示した。

その他の群は、コントロール (I-a, II-a) と比較して特別の変化はなかった。

5. 小括

ウサギ下腹壁皮弁阻血モデルを用いた再灌流傷害に対し、10 時間阻血群では抗酸化剤の動脈内注入では効果なかったが、抗血栓剤の持続動脈内注入を単独で行っただけでも 100% 皮弁は生着した。一方、12 時間阻血群では抗酸化剤の動脈内注入と併用することにより皮弁生着率を有意に向上させることができた。しかし、組織学的にはそれらの皮弁では皮膚付属器は温存されていたが、正常例に比較すると皮膚の厚みは減少し、血管壁も肥厚して筋肉組織は変性していた。

IV 考 察

切断肢・指再接着術や遊離複合組織移植術の失敗原因として、外傷や放射線治療後の移植床血管の挫滅がもとでおこる術後吻合部血栓、および血流再開までに長時間を要した際に組織の循環が得られない状態となる、いわゆる no-reflow phenomenon がある。そこで、これらの問題点を解決すべく、上記の実験を施行した。以下、それぞれにつき考察を行った。

1. ウサギ下腹壁皮弁を用いた血栓形成モデルへの応用

まず、術後吻合部血栓の予防法につき考察した。

血管吻合に際しての留意点としては、①血管切断両端部の十分な debridement を行うこと、②動脈中枢からの力強い流血が得られること、③必要があれば、ためらわず静脈移植を行うこと、④可能なかぎり多くの血管を吻合すること、などが重要である。しかし、手術用顕微鏡下で内膜に異常があると思われる部位を切除し、正常に見える血管端どうしを吻合したつもりでも実際には多少の損傷部分が残っているのが現実である。血管内皮には、抗凝固能ならびに線溶能があり、吻合部に挫滅内皮が存在すると血栓形成はより促進されることになる。

そこで血栓の予防、治療として①抗凝固剤⁴⁾、②線溶剤⁵⁾ならびに③血管拡張薬⁶⁾、などの全身投与が行なわれ、その有効性が報告されている。

著者の属する病院でも切断指再接着術後、一日量 heparin 1 万単位、urokinase 24 万国際単位を 10 日間全身投与してきたが、それでも成功率は 86% であった⁷⁾。

これは静脈内に投与された上記の薬剤が、血中の阻害物質や各種の臓器において代謝され、目的とする部位に達した際には有効な血中濃度にいたっていないのが原因ではないかと想像された。これらを解消するため、全身での代謝を受けない間に速やかに吻合部に必要最小量を投与するには、局所持続動脈内注入を行うのが有利であると考えた。しかも、heparin は凝固系が活性化される前に投与すれば少量ですむ⁸⁾だけでなく、urokinase を含んだ血栓は通常よりも溶解しやすいという報告⁹⁾や、血栓溶解能だけでなく予防的作用があるとするもの¹⁰⁾もあり、血管吻合以前に開始しておくのが最善と思われた。

この持続動脈内注入法については、心臓外科、脳外科領域だけでなく遊離組織移植^{11), 12)}ならびに切断指再接着術後¹³⁾に発生した血栓溶解を目的として行われた報告が散見されるが、血管吻合以前より予防的に開始したというものはなかった。

しかし、動脈内注入を行うことにより、①静脈内注入に比して目的とする局所で有意に薬剤の効果が得られるのか、②どの薬剤を用いるのが良いのか、など臨床的には未解決の問題が残されている。

実験的には、Greenberg ら¹⁴⁾は動脈血栓モデルにヘパリンの静脈内注入を、Hergrueter¹⁵⁾は、tissue plasminogen activator (t-PA) の動脈内注入を 3 日間行っているが、より臨床的応用を目指すためには遊離組織移植をモデルとして選択する必要がある。しかも、吻合部血栓は術後 30 分前後ならびに 3~5 日目に発生することが多いとされており、少なくとも 7 日間は持続注入するのが望ましい。

薬剤は、臨床例で使用している heparin と urokinase を選んだが、さらに、吻合部局所でのみ有効な血中濃度になる薬剤の投与速度を決定する必要があった。そこで、heparin のモニターとして活性化部分トロンボプラスチン時間ならびにヘパリン濃度を、urokinase のモニターとしてはアンチプラスミンを選び、それぞれを Table 1, 2, 3 のごとき投与速度で注入した。その結果、heparin は 10U/kg/d, urokinase は 100IU/kg/d とすることで、動脈内注入では 5 分後だけでなく、飽和されたと思われる 4 時間後でさえ、薬剤の血中濃度は吻合部局所で有意に高かったのに対し、静脈内投与では全身での代謝を受けて目的とする部位ではまったくその効果を発揮していないことがわかった。

そこで、下腹壁皮弁移植術に heparin と urokinase を上記の投与速度で 7 日間持続的に動脈内注入したところ、生着率は 80 % に上昇した。一方、静脈内注入した場合には 35 % であり、局所持続動脈内注入法はコントロールならびに同量を静脈内注入した場合に比し、有意に生着率を向上させることがわかった (Table 4)。

つまり、heparin と urokinase の必要最小量を動脈内注入することによって血栓を効果的に予防し得ることを確認した。

また、肥厚した動脈内膜径の減少傾向がみられたのは、結紮により停滞していた血流が血管吻合により再開されて力学的な拡張作用だけでなく、内膜への血行が回復したためとも考えられ、heparin や urokinase の直接作用とは断定できない。

ただ失敗例の中で大量の血腫により血管が圧迫された結果、まず静脈循環不全を生じて壊死に陥ったと思われるものが 2 皮弁あり、創部の十分な止血とドレナージが必要であることが分った。

2. ウサギ下腹壁皮弁を用いた再灌流傷害モデルへの応用

次に、切断肢・指ならびに遊離組織移植のもう一つの不成功原因である再灌流傷害の対策について考察した。

この組織傷害をもたらす原因として、活性酸素の存在が強調されている。皮弁においても 1983 年、Manson ら¹⁶⁾が、rat の島状皮弁阻血モデルにおいて再灌流傷害に対して SOD が有効であったと報告したのがきっかけとなり、有茎皮弁では 1986 年、Angel ら¹⁷⁾が deferoxamine を、遊離皮弁では 1986 年、Manson ら¹⁸⁾が SOD を使用し、阻血後の再灌流障害において生着率を向上しえたことと報告している。その他にも、1985 年、Korthuis ら¹⁹⁾が犬の筋肉に対して SOD を、また 1988 年、Weiss ら²⁰⁾は rat を使用した血管柄付骨移植モデルにおいて、SOD

を使用して同様に効果があったと述べている。

活性酸素の源としては種々考えられているが、中でも xanthine oxidase 系が重視されている^{21), 22)}。これは、組織の虚血中に嫌気性代謝が進行して hypoxanthine が蓄積し、血流再開後、酸素と反応して O_2^- 、 H_2O_2 、 $OH\cdot$ などの活性酸素が発生するとする仮説である。これらは、細胞膜を構成している不飽和脂肪酸の過酸化を起こすことで細胞障害を引き起こすと考えられている²²⁾。しかも、最も損傷を受けやすいのは血管内皮細胞であることが、電子顕微鏡的観察から明らかにされている²²⁾。

一方、阻血そのものによっても血管内での血液の sludging や血栓形成が起こるばかりでなく、細胞レベルでも細胞膜内の Na-K pump の失調から Na, Ca イオンが細胞内に入り込み細胞内の浸透圧が上昇して細胞浮腫が生じる²⁴⁾。この変化は、血管内皮細胞にも障害をおよぼすと考えられる。また、これらの変化はある一定時間までは可逆的であるが、限度を越えると血液の sludging や血栓形成が優勢となり、不可逆的な変化に移行する²⁵⁾。May ら²⁶⁾は、この限度を 12 時間と述べている。再灌流障害のモデルにおいて、阻血時間は各種臓器の場合は、数分から数十分であるのに比し、皮弁の場合には数時間から数十時間にもおよぶので、阻血そのものによる影響を無視しえない。また、阻血時間が長くなるほど血管内皮細胞が持つ線溶活性が低下し、6 時間阻血でさえその回復に要する時間は 96 時間であるという¹⁾。その他にも urokinase や streptokinase などの線溶剤を使用して再灌流障害に効果があったとする報告もある^{1), 2)}。

以上のような観点から、再灌流開始前より抗酸化剤と抗血栓剤を併用して動脈内注入するのが最善ではないかと考え、ウサギ下腹壁皮弁阻血モデルを用い、阻血時間と注入薬剤の種類を変え検討した。

まず、抗血栓剤として抗凝固剤には heparin を、線溶剤には urokinase を選んだ。これらの薬剤にははたして、再灌流障害に対する効果があるかどうかを調べるため、投与量は先に行った下腹壁皮弁移植術の際にちいた必要最小限の投与速度の 2 倍とした。注入期間は、血管内皮細胞の回復に要する期間を考慮して 7 日間とした。

次に、抗酸化剤に関しては、有効であったという数多くの報告があるが投与方法、種類、投与量ならびに溶解液ともに一定の見解はみられていない。活性酸素が発生するのは、酸素化された血液が阻血中に生じた hypoxanthine に接した時であり、この際に抗酸化剤が高濃度で存在すれば十分な効果を発揮できるのではないかと考え、再灌流直前より皮弁栄養動脈のすぐ近くから動脈内注入を開始した。次に抗酸化剤として allopurinol, SOD,

catalaseなどを単独あるいは併用して投与したという数多くの報告があるが、hypoxanthine 酸化過程で生ずる活性酸素をできるだけ少なくするためには、上記のすべての抗酸化剤を使用するのが理想的である。しかし、allopurinol は強いアルカリ液にしか溶解できず、これを使用した場合、注入液の pH が上昇してしまい、局所から動脈内注入するには不向きである。そこで、抗酸化剤には中性液に溶解できる SOD と catalase を選んだ。その投与量は、文献的報告から最大限の SOD: 30000U/kg, catalase: 30000U/kg とした。また再灌流前に使用する灌流液は、できるだけ細胞外液に近いものがよく²⁵⁾、生理的食塩水で灌流することにより生存率がえって低下したという報告²⁷⁾がある。よって溶解液としては、細胞外液の電解質組成に近い、中性の lactated Ringer 液を用いた。また、溶解液そのものによる影響を調べるため、lactated Ringer 液のみの動脈内注入群も追加した。

大腿動・静脈に clipping を行うことで皮弁を阻血状態にしている報告もあるが阻血時間が長く、clipping による血管内皮細胞の損傷を除外しえない。そこで、再灌流時には結紮部分を切除し、血管吻合を行った。

皮弁色調の経時的な観察から、12 時間阻血のコントロール群ならびに lactated Ringer 液の動脈内注入群を除いて、その他の生存率の低い群でも完全壊死例は少なく、部分的な壊死を示したものが多くみられ、皮弁内に生存した皮膚を含んでいた。そのような例では、皮下脂肪は残存し、下腹壁動・静脈中枢部はともに開存している場合が多かった。12 時間阻血後に抗凝固剤と線溶剤の 7 日間の持続的動脈内注入と抗酸化剤の灌流開始後 30 分間の動脈内注入を併用した群では、3 日目の皮弁の色調はむしろ赤味をおび、皮膚組織内の毛細血管血流が増加しているのではないかと想像された。

再灌流開始 30 分後の静脈還流の観察では、10 時間阻血では治療の有無にかかわらず比較的早期に静脈還流を認めたが、12 時間阻血では抗酸化剤の動脈内注入を行った II-d, e 群のみ静脈還流が観察された。つまり、10 時間阻血で発生する活性酸素量では、血管内皮細胞にさほどの障害をおよぼさないが、阻血時間が 12 時間を越えると静脈還流を妨げるほどの活性酸素が産み出されているのではないかと想像された。また、II-d 群においては下腹壁静脈中枢部の還流は観察されたが、末梢部は停滞したままであり、毛細管レベルでの血流が阻害されていることがうかがわれた。

皮弁生存率の結果から、10 時間阻血群では、コントロールに比較して有意に治療成績が向上したのは抗血栓剤を持続動脈内注入した I-b 群のみであり、抗酸化剤や

lactated Ringer 液を単独で動脈内注入した群ではまったく効果がなかった。一方、12 時間阻血群では抗酸化剤と抗血栓剤をそれぞれ単独で投与しただけでは有意の効果はなく、両者を併用することで生存率が著明に向上させることができた。しかし、組織学的には付属器を含めて皮膚ならびに皮下脂肪は温存されているものの panniculus carnosus は変性し、血管壁は肥厚しており、かなりの損傷を受けながらも阻血に強い皮膚と皮下脂肪が辛うじて生存したのであろう。

以上より、10 時間までならば、阻血そのものによる障害のほかに再灌流後に生じる活性酸素による障害が加わっても、抗凝固能ならびに線溶活性さえ維持されれば血管内皮細胞は十分回復しうることがわかった。しかし、阻血時間が 12 時間を越えると、これらの変化はそれぞれ増強されて静脈還流が妨げられる結果となった。たとえば、抗酸化剤の動脈内注入により下腹壁静脈本幹内の血液の sludging や微小血栓が消失し、静脈還流が確認されたとしても、皮膚直下を走行する静脈は黒くよどんだままで、A-V shunt を通った血液の流れだけを観察している可能性がある。この点に関しては、carbon や fluorescein などを注入した実験では皮下脂肪までは流入するが皮膚は染らず、毛細血管レベルでの循環障害が皮膚壊死の主因であると報告されている²⁶⁾。抗酸化剤の動脈内注入だけでは毛細血管レベルの循環を改善させることは困難なのかもしれないが、抗凝固剤と線溶剤の持続動脈内注入を併用することにより微小循環をも改善しうることがわかった。

言い換えると、10 時間の阻血では活性酸素による組織障害は皮弁生存にとってさほど問題ではなく、むしろ阻血そのものによる障害の方が強い影響をおよぼしていると考えられた。しかし、阻血時間が 12 時間を越えると、線溶活性の低下だけでなく活性酸素による内皮細胞の障害もさけられない程度にまで達していることが間接的に証明された。報告者により阻血モデルに違いがあり、阻血時間とその生存率を直接比較することは不可能ではないかと思われる。しかし、内臓に比して代謝活性の低い皮膚組織などは、かなり長時間阻血状態におかれなないと組織障害を引き起こすほどの活性酸素は発生せず、阻血そのものによる血管内皮細胞の障害にもとづく線溶活性の低下の方が重要な要因であることがわかった。このことは、同様に代謝活性の低い骨組織にもあてはまるものと考えられる。

これらの結果を直接臨床にむすびつけるには動物の種類、阻血状態、阻血組織の種類、組織の大きさの違いならびに外気温など考慮しなければならないであろう。し

かし、切断肢・指再接着や遊離組織移植においても、阻血時間が短ければ抗凝固剤と線溶剤の持続動脈内注入だけでも良好な結果をえられるであろうが、抗酸化剤の動脈内注入と併用することでさらに長時間阻血の組織をも生着させることが可能になると確信している。

V 結 語

1. ウサギ下腹壁皮弁移植を用いた血栓形成モデルならびに再灌流傷害モデルへの抗血栓剤と抗酸化剤の動脈内注入の効果を検討した。
2. ウサギを使用した内膜肥厚のある移植床動脈への下腹壁皮弁移植術の際に、heparin 10U/kg/h, urokinase 100IU/kg/h の投与速度で7日間、持続動脈内注入することにより、コントロールならびに全身投与群に比較して有意に生着率を向上させることができた。
3. 動脈内注入を選択することにより局所での薬剤の濃度を必要最小量で有意に高めることができた。
4. ウサギ下腹壁皮弁阻血モデルを用いた再灌流障害に対し、10時間阻血群では抗血栓剤の持続動脈内注入のみでも有効であったが、12時間阻血群では抗酸化剤の動脈内注入と併用することにより、有意に皮弁生着率を向上させることができた。
5. 抗酸化剤の動脈内注入により、赤血球の血管外への漏出を抑制できることがわかった。
6. 10時間阻血の抗血栓剤を持続動脈内注入した群ならびに12時間阻血の抗血栓剤と抗酸化剤の動脈内注入を併用した群における生着した皮弁では、汗腺や毛根などの付属器は温存されていたが、皮膚の厚みは正常例に比較すると薄く、血管壁は肥厚し、筋肉組織は変性していた。

(本研究の要旨は、第32回手の外科学会、第16回マイクロ学会、ならびに第33回日本形成外科学会において発表した。)

稿を終えるにあたり、御懇切なる御指導、御校閲を賜りました恩師玉井 進教授ならびに終始直接の御指導をいただいた福居顕宏博士に心より感謝いたします。

文 献

- 1) Jacobs, G. R., Reinisch, J. F. and Puckett, C. L.: *Plast. Reconstr. Surg.* 68: 737, 1981.
- 2) Zdeblick, T. A., Shaffer, J. W. and Field, G. A.: *J. Bone and Joint Surg.* 69-A: 442, 1987.
- 3) Fukui, A. and Tamal, S.: *J. Reconstr. Microsurg.* 4: 285, 1988.
- 4) 島村浩二: 十全会誌. 95: 531, 1986.
- 5) Cooley, B. C., Jones, M. M. and Dellon, A. L.: *Microsurgery* 4: 1, 1983.
- 6) 川崎晃義, 石井権二, 北川敏一, 坂田盛行, 石井みさ子, 小島正紀: 応用薬理 17: 1043, 1979.
- 7) 福居顕宏, 玉井 進: 切断手・指再接着の適応と術後の機能評価. 整形外科 Mook, 48. 金原出版, 東京, P 38, 1987.
- 8) Wessler, S. and Yin, E. T.: *Circulation* 47: 671, 1973.
- 9) 伴 一郎: *Medical Postgraduates* 17: 382, 1979.
- 10) 鈴木武彦, 高野静子: 日血会誌. 41: 890, 1978.
- 11) Gange, S., Laherge, L. C., Rivard, G. E. and Garel, L.: *Plast. Reconstr. Surg.* 79: 974, 1987.
- 12) Lipton, H. A. and Jupiter, J. B.: *Plast. Reconstr. Surg.* 79: 977, 1987.
- 13) 三宅信一郎, 山崎慶樹, 三河義弘, 日野洋介, 赤司浩二郎, 奥坊康士, 林田武継, 中川 洋, 渡辺 良: 整・災外. 30: 1493, 1987.
- 14) Greenberg, B. M., Masem, M. and May, J. W.: *Plast. Reconstr. Surg.* 82: 463, 1987.
- 15) Hergrueter, C. A., Herden, J., Kerch, R. and May, J. W.: *Plast. Reconstr. Surg.* 81: 418, 1988.
- 16) Manson, P. N., Anthenelli, R. M., Im, M. J., Bulkley, G. B. and Hoop, J. E.: *Ann. Surg.* 198: 87, 1983.
- 17) Angel, M. F., Narayanan, K. and Swarz, W. M.: *Br. J. Plast. Surg.* 39: 469, 1986.
- 18) Manson, P. N., Narayan, K. K., Im, M. J., Bulkley, G. B. and Hoopes, J. E.: *Surgery* 99: 211, 1986.
- 19) Korthuis, R. J., Granger, D. N. and Townsley, M. I.: *Cir. Res.* 57: 99, 1985.
- 20) Weiss, A-P. C., Moore, J. R., Randolph, M. A. and Weiland, A. J.: *Plast. Reconstr. Surg.* 82: 486, 1988.
- 21) McCord, J. M. and Roy, R. S.: *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 601: 1346, 1982.
- 22) McCord, J. M.: *Science* 185: 529, 1974.
- 23) Marzella, J., Jesudass, R. R., Manson, P. N., Myers, R. A. M. and Bulkley, G. B.: *Plast. Reconstr. Surg.* 81: 742, 1988.
- 24) Chandry, I. H.: *Am. J. Physiol.* 245: 117, 1983.
- 25) Rosen, H. M., Shivjak, B. S. and McBrearty, F. X.: *Plast. Reconstr. Surg.* 76: 737, 1985.

- 26) May, J. W., Chait, L. A., Obrien, B. M. and Hurley, J. V.: Plast. Reconstr. Surg. **61**: 256, 1978.
- 27) Harashina, T. and Bunke, H. J.: Plast. Reconstr. Surg. **61**: 421, 1978.

Figures and legends

- Plate 1. Change of thicknes of arterial intima.
 a : normal
 b : before infusion
 c : after infusion
- Plate 2. Cross section of group I -a (H-E, $\times 200$).
 a : before reperfusion
 b : 30 min. after reperfusion
 c : 3 days after reperfusion
- Plate 3. Cross section of normal skin (H-E).
 a : $\times 40$
 b : $\times 200$
- Plate 4. Cross section of group I -b (H-E, 3 days after reperfusion).
 a : $\times 40$
 b : $\times 200$
- Plate 5. Cross section of group I -b (H-E, 7 days after reperfusion).
 a : $\times 200$
 b : $\times 200$
- Plate 6. Cross section of group II -a (H-E, $\times 200$).
 a : before reperfusion
 b : 30 min. after reperfusion
 c : 3 days after reperfusion
- Plate 7. Cross section of group II -d (H-E, $\times 200$).
- Plate 8. Cross section of group II -e (H-E, $\times 40$).
 a : 3 days after reperfusion
 b : 7 days after reperfusion

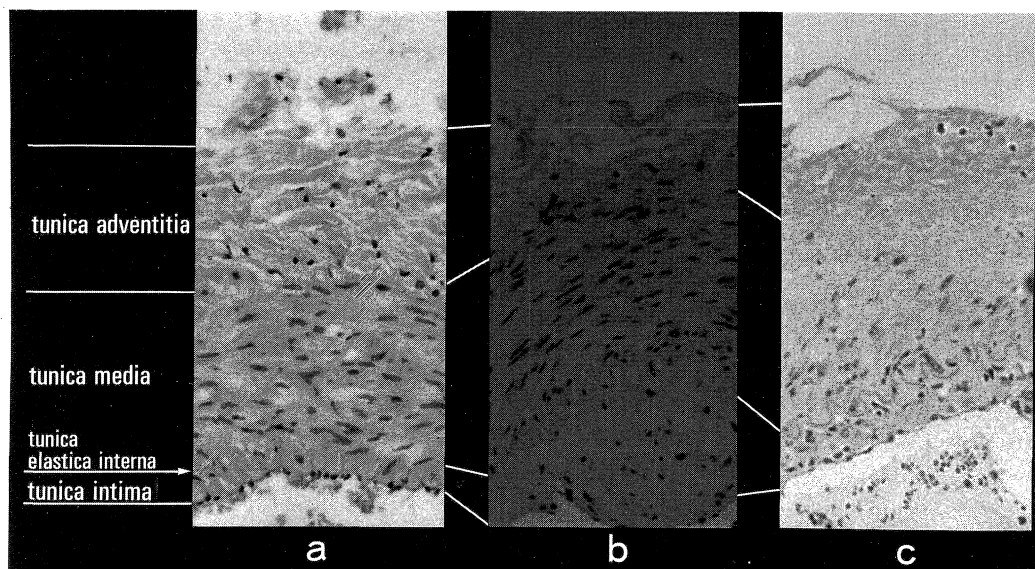


Plate 1

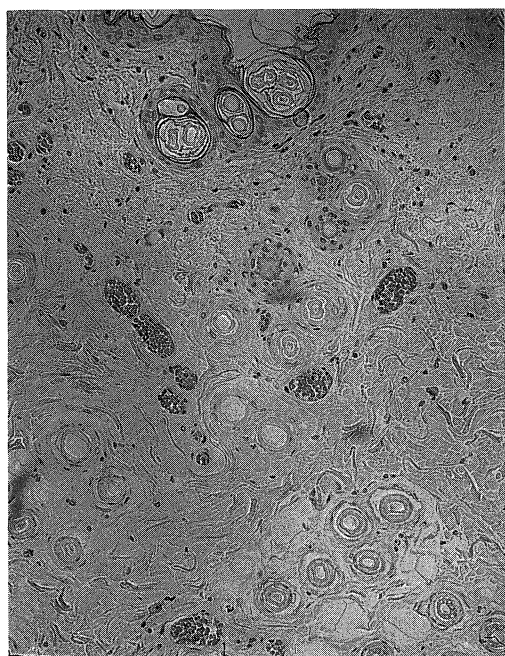


Plate 2b

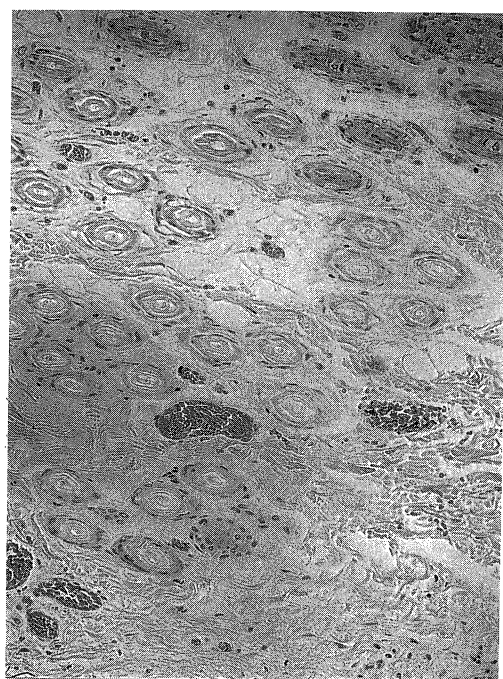


Plate 2a

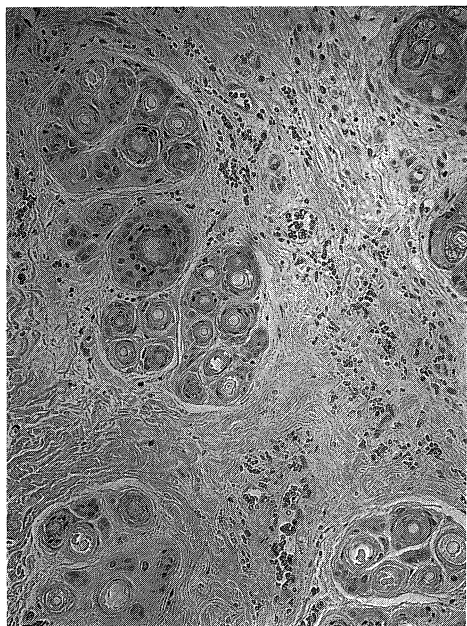


Plate 2c

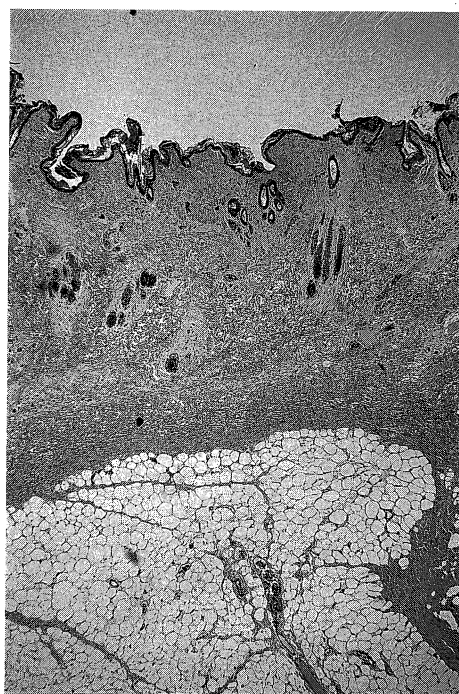


Plate 3a

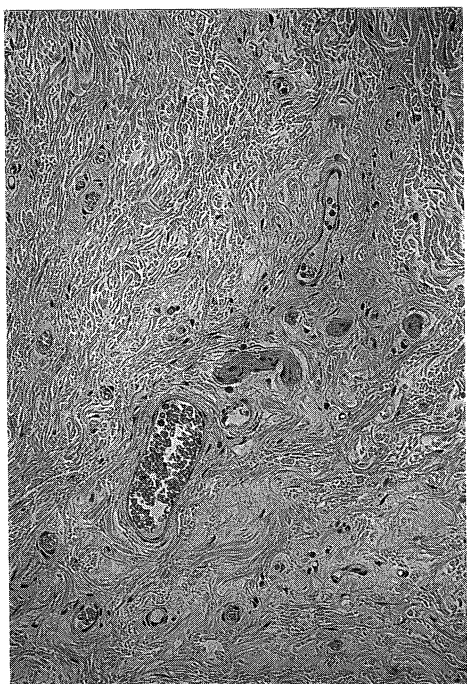


Plate 3b

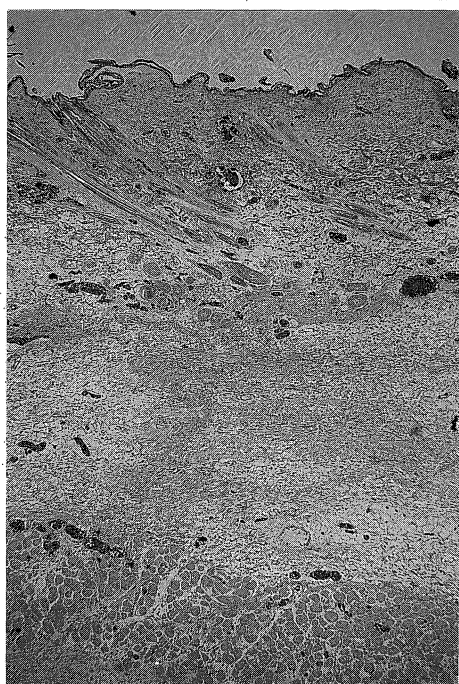


Plate 4a

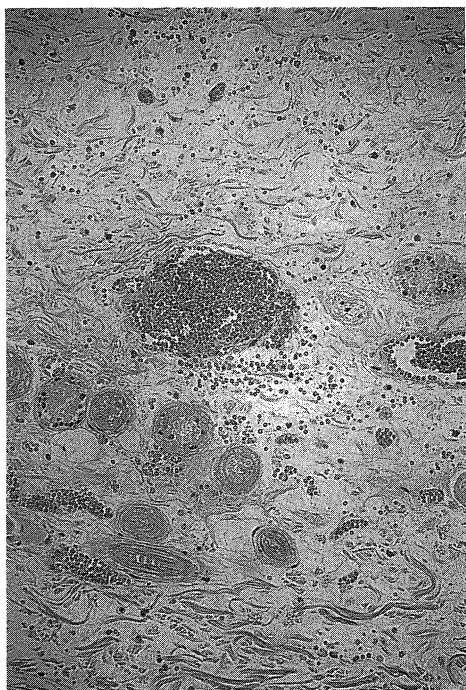


Plate 4b

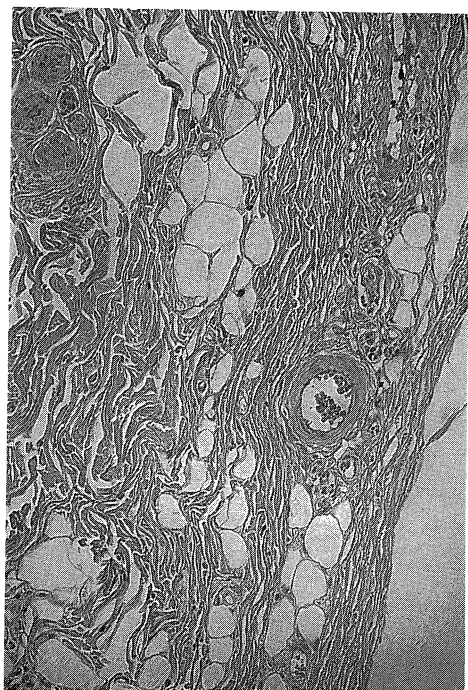


Plate 5a

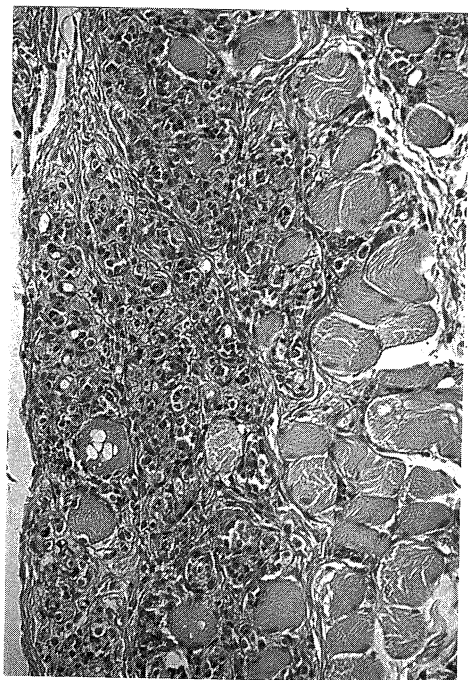


Plate 5b

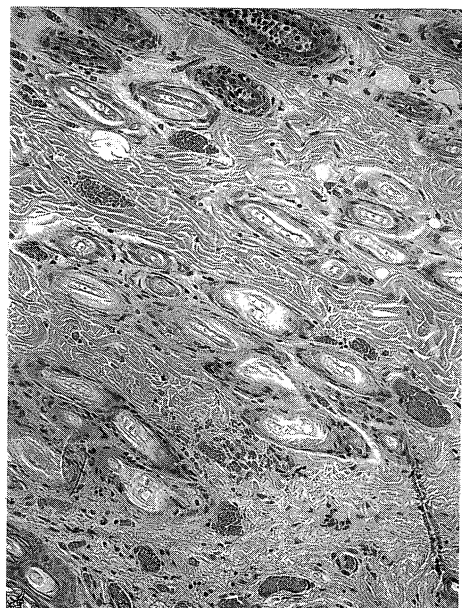


Plate 6a

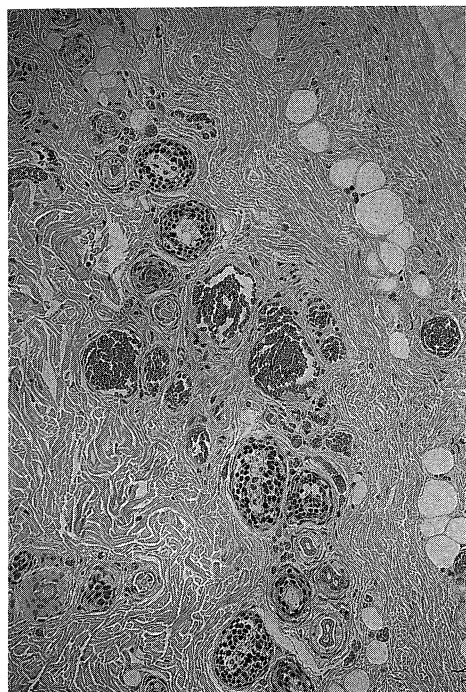


Plate 6b

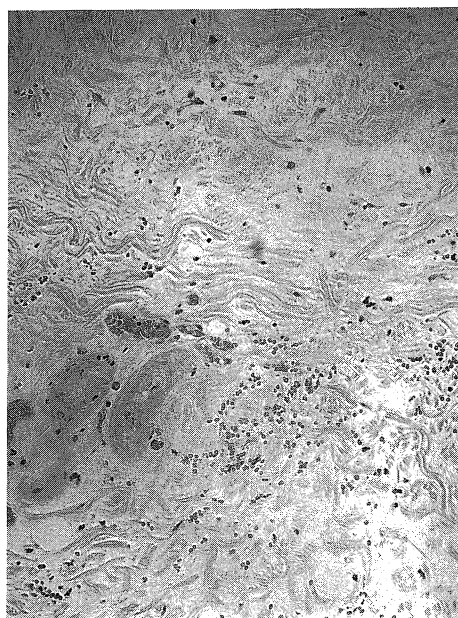


Plate 6c

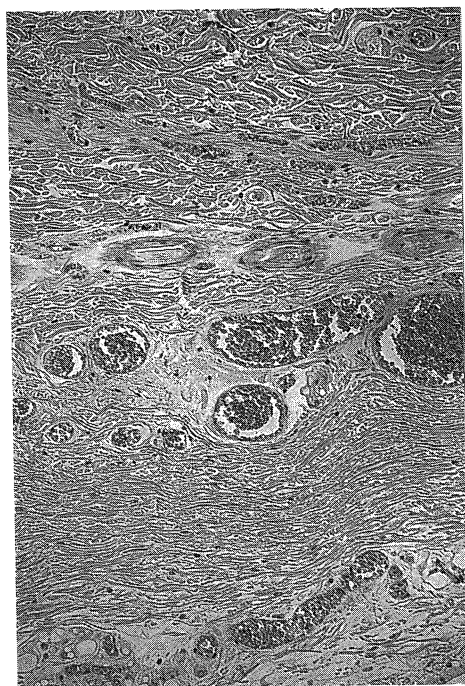


Plate 7

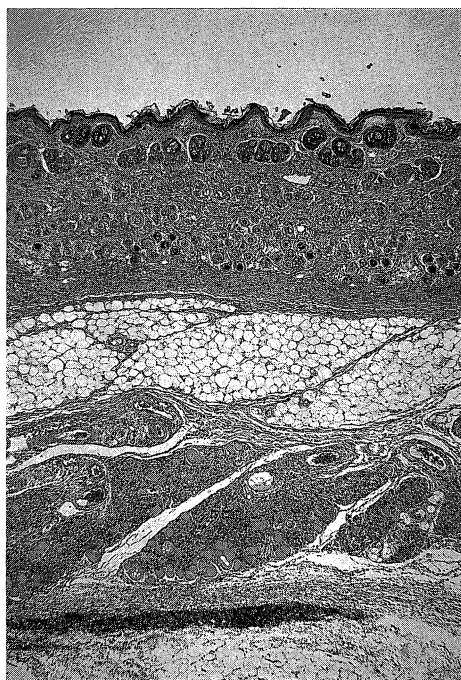


Plate 8a

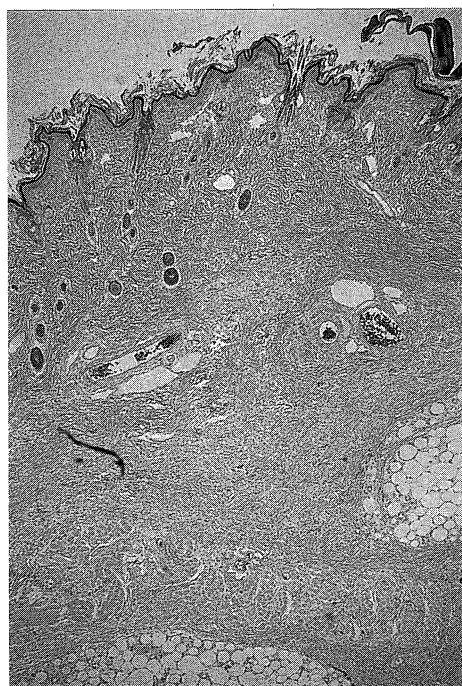


Plate 8b